

УДК 575.224.46.044

ЭКСПРЕССИЯ ЭМБРИОТРОФНЫХ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ НА ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННЫХ СТАДИЯХ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ В РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНАХ КРЫС

С.В. Федорова, А.В. Мадич**Институт биологии животных НААНУ, Львов, Украина***Институт Генома человека Кембриджского Университета, Великобритания,
e-mail: fyodorova2000@mail.ru*

Введение

Свойство эмбрионов обеспечивать собственное развитие от стадии зиготы до бластоцисты независимо от окружения материнского организма, в условиях *in vitro*, является признаком того, что механизмом раннего эмбрионального развития можно манипулировать и регулировать посредством изучения эмбрионально-маточных взаимодействий [1, 2]. Значительный прогресс в этой области был достигнут исследованиями процессов раннего эмбриогенеза у животных с применением клеточных культур, способных моделировать отношения между материнским окружением и доимплантационным эмбрионом [3, 4, 5].

Фидерный клеточный монослой, который играет роль поддерживающего клеточного матрикса, способен моделировать *in vivo* окружение эффективнее, чем обычная кондиционная среда или её синтетические аналоги. Попытки минимизировать эмбриональные потери активацией развития эмбрионов методом их культивирования обусловили использование культуры эпителиальных клеток яйцеводов [6, 7, 8]. На фоне открытия специфических для яйцепроводов эмбриотрофных ростовых факторов, среди которых инсулиноподобный фактор роста (ИФР), инсулин, эпидермальный фактор роста (ЭФР) и трансформирующий фактор роста (ТФР- β), и специфики их взаимодействия по отношению к доимплантационной стадии эмбрионального развития встал вопрос о возможности использования клеточной культуры последних для регуляции процессов раннего эмбриогенеза [9].

Следовательно, дальнейшие исследования по изучению функциональных свойств и взаимодействий специфических ростовых факторов и их участия в сигнальных путях передачи маточного сигнала к эмбриону и обратно, к клеткам материнского окружения в условиях *in vivo* и *in vitro* являются актуальными.

Методы исследований

Экспериментальная часть работы была выполнена на эмбрионах крыс линии *Wistar* различных стадий развития. Ооциты и эмбрионы получали от самок лабораторных животных путем вымывания репродуктивных органов этаназированных животных.

Лабораторные животные содержались на стандартном рационе при 12-часовом световом периоде в виварии Института биологии животных НААН Украины. Для исследований использовали самок крыс в возрасте 6 – 8 недель в условиях естественного спаривания или после гормональной стимуляции эструса. Стадию эстрального цикла самок крыс определяли по влажлищным мазкам. Исследования на животных выполняли с учётом положения Конвенции Совета Европы (от 04.04.1997) и постановления Кабинета Министров Украины от 24.08.2002 № 1256.

После морметрической оценки репродуктивных органов, полученных на 1-й, 3-й и 6-й день после коитуса из них изготавливались лизаты для последующего исследования спектра белков методом Вестерн-блот анализа. Использовались реактивы фирм-производителей Acros Organics®, Merck®, «Макрохим». В готовых лизатах измеряли концентрацию белка методом Лоури с реактивом Фолина на биохимическом анализаторе. После полного испарения жидкого азота гомогенаты ресуспендировали в стандартном лизирующем буфере с добавлением ингибиторов протеаз (4,2-аминоэтилбензинсульфонилфлюорид; E-64; Б-статин; лейпептин; апротинин; ЭДТА), Sigma®.

Для контроля электроблоттинга и определения относительных молекулярных масс спектра белков, которые мы исследовали, использовались белковые стандарты с молекулярными массами от 6,5 до 66 кДа (Low Molecular Weight Range, Sigma®). Белки, разделённые электрофоретически в ПААГ, переносили на поливинилдифторидную мембрану (PVDF, Millipore,). После электроблоттинга блокирование свободных центров связывания проводили в забуференном физиологическом растворе, содержащем 5% обезжиренного молока и 0,01% Твин-20 (ЗФРТ), в течение 60 минут при комнатной температуре. Далее мембраны инкубировали с первичными моноклональными антителами: кроличьими Anti-Epidermal Growth factor antibody produced in rabbit (Sigma, США), мышинными Monoclonal Anti-Transforming Growth Factor- β 1 antibody produced in mouse (Sigma, США) и антителами козы Anti-Insulin-Like Growth Factor-I antibody produced in goat (Sigma, США) в соотношении 1:2000 в ЗФРТ на протяжении 90 мин, и также со вторичными поликлональными анти-мышинными/анти-крысиными антителами козы, конъюгированными с щелочной фосфатазой (Sigma, США), в соотношении 1:5000 в ЗФРТ в течении 30 минут. Детекцию иммунных комплексов производили с использованием коммерческого раствора субстрата для щелочной фосфатазы CDP-Star (Tropix, Великобритания). Визуализацию проводили при помощи рентгеновской плёнки ECL HyperFilm (Amersham, США) и набора для проявления плёнок (Kodak).

Культуры клеток получали энзимным или механическим способами с их частичной модификацией в зависимости от условий исследований (рисунок 1). Для получения культуры клеток яйцеводов использовали репродуктивные органы крыс. Для культивирования ооцитов, эмбрионов и культур клеток использовали пластиковые чашки Петри с адгезивным покрытием (Corning®, Sigma) диаметром 35 мм и многолунковые (4- и 6-луночные) планшеты (Nunclon™ D, Sigma). В исследованиях использовали питательные среды ДМЕМ (BioChem, США), M16 (Sigma, США), M2 (Sigma, США), ТМ-199, (Sigma, США), антибиотики – гентамицин (4% раствор для инъекций), смесь антибиотиков для клеточной биологии стрептомицин/ пенициллин (Sigma, США), амфотерицин (Sigma, США), фетальную телячью сыворотку (Sigma, США). Среды стерилизовали путем фильтрации с помощью фильтров с размером пор 0,45 и 0,22 мкм (Minisart, США).



1 – двухбластомерный эмбрион; 2 – ранние морулы; 3 – поздние морулы; 4 – ранние бластоцисты.

Рисунок 1 – Эмбрионы разных стадий развития, полученные от самок линии *Wistar* в результате гормональной обработки

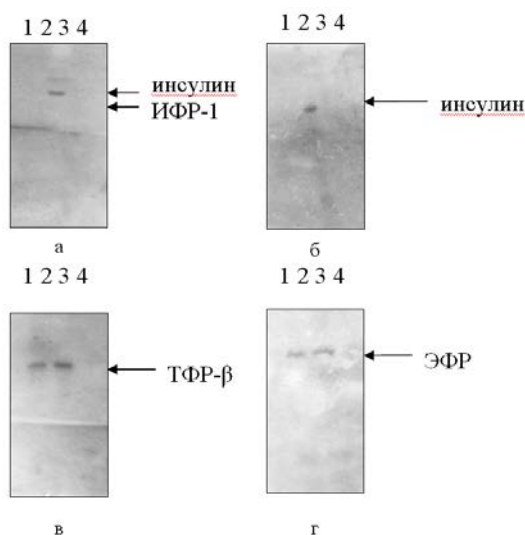
Результаты и обсуждение

Динамика экспрессии эмбриотрофных ростовых факторов на предимплантационных стадиях эмбрионального развития в репродуктивных органах крыс. Комплексные исследования динамики синтеза репродуктивными органами самок ростовых факторов на

ранних стадиях становления беременности были выполнены на 1-е, 3-и и 6-е сутки после оплодотворения, поскольку в это время происходят контрольные изменения как в материнском организме, так и в эмбрионе.

В 1-е сутки после оплодотворения происходит активное митотическое дробление первичных бластомеров. На 3-и сутки происходит полное изменение в эмбриональной морфологии, связанное с первичной дифференциацией бластомеров на эмбриобласт и трофобласт с образованием бластополости. Шестые сутки являются последним предимплантационным периодом, когда эктоплацентарный конус вытянутой бластулы максимально активно воздействует на мягкие ткани матки и, таким образом, участвует в их подготовке к трофобластической инвазии.

Согласно нашей гипотезе, в эти дни действие эмбриотрофных ростовых факторов должно проявляться максимально, включая особенности их взаимодействия друг с другом в разные периоды. С помощью Вестерн-блоттинга мы исследовали динамику синтеза низкомолекулярных белков, которые принимают участие в формировании эмбрионально-маточных взаимодействий с использованием моноклональных антител.



1 – яичники, 2 – яйцеводы, 3 – матка, 4 – рога матки.

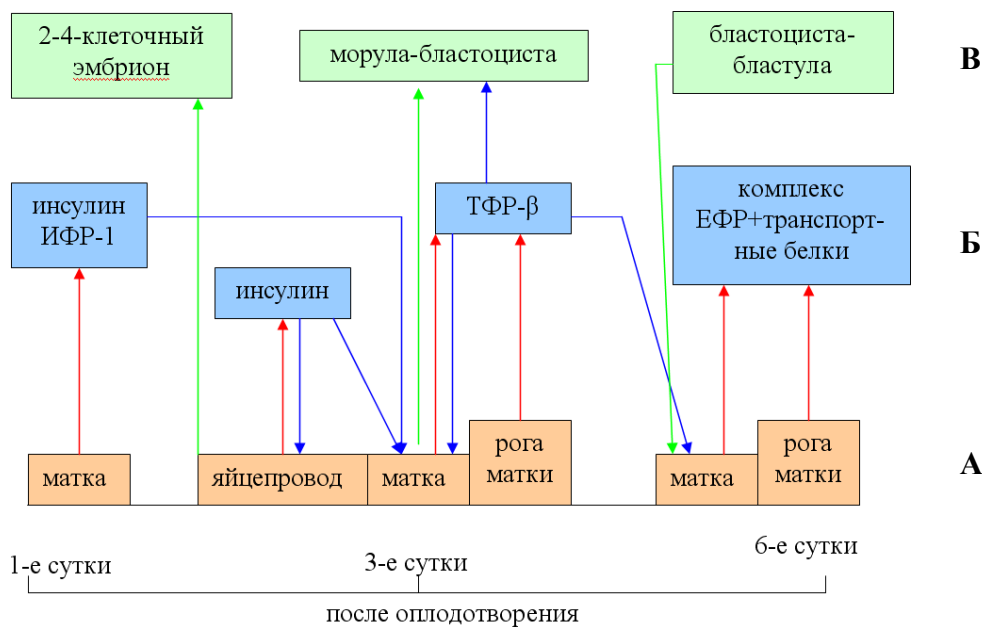
Рисунок 2 – Белковые факторы роста репродуктивных органов самок крыс в разные дни доимплантационных стадий беременности

На 3-й день после оплодотворения обнаружены белки инсулиновой группы – инсулин и ИФР-1, которые контролируют процессы митоза, пролиферации яйцепровода и дифференциации и способствуют децидуализации клеток стромы в эндометрий. Сигнал инсулина на первый день был слабее, чем на 3-й, что доказывает его митогенную функцию в раннем эмбриональном развитии (рисунок 2, а). На 1-й день после оплодотворения инсулин и инсулиноподобный фактор роста синтезировался в тканях матки, на 3-й день инсулин был выявлен в тканях яйцеводов (рисунок 2, б). На 3-й день в матке и рогах матки также найдено ТФР-β (рисунок 2, в). Это полностью соответствует литературным данным, в которых описано предполагаемое контрольное воздействие ТФР-β на более поздних предимплантационных стадиях. У крыс имплантация происходит на 7-й день после оплодотворения, так что на 3-й день экспрессия ТФР-β значительно возрастает, особенно в матке (как в самом теле, так и в рогах – именно там и был обнаружен этот белок). Эмбриональный ТФР-β повышает рецептивность эндометрия к бластоцисте и облегчает адгезию и инвазию последней. ТФР-β материнского происхождения, наоборот, подавляет избыточную инвазию трофобласта и, будучи в избытке, может вообще ингибировать имплантацию.

На 6-й день после оплодотворения у самок крыс в матке и ее рогах был обнаружен секреторный комплекс ЭФР с молекулярной массой 25,0 кДа, состоящий из молекулы ЭФР и

белков-транспортеров, который является неактивной формой этого ростового фактора, но появляется именно перед началом имплантации (рисунок 2, г). Сам ЭФР найден в эндометрии матки именно в том месте, где будет находиться «окно имплантации» – место прикрепления и последующей инвазии бластоцисты. У псевдобеременных самок в аналогичных тканях репродуктивных органов экспрессия этих белков в определенном спектре отсутствовала.

Теоретическая модель участия эмбриотрофных ростовых факторов тканей репродуктивных органов самок в раннем эмбриогенезе при становлении беременности. На основе экспериментально полученных нами данных и литературных источников мы построили теоретическую модель участия инсулина, инсулиноподобного фактора роста-1, трансформирующего фактора роста- β и эпидермального фактора роста в эмбрионально-маточных взаимодействиях на доимплантационной стадиях развития эмбрионов (рисунок 3).



А – материнские органы и их синтезирующий профиль; Б – ростовые факторы и их влияние на материнский организм и эмбрион; В – стадии развития эмбриона и конечный эффект действия ростовых факторов на материнские органы и эмбрион.

Рисунок 3 – Теоретическая модель регуляции взаимодействий между материнским организмом и эмбрионом на доимплантационных стадиях беременности

На 1-й день после оплодотворения ткани матки синтезируют инсулин и ИФР-1. Эти факторы стимулируют митоз эпителиальных и эндометриальных клеток, готовя строму эндометрия к процессам децидуализации. На 3-й день после оплодотворения яйцеводы начинают активно синтезировать инсулин, который стимулирует пролиферацию клеток яйцеводов. Увеличение количества glandулярных клеток эпителия способствует развитию эмбриона и его передвижению до матки. Рога и тело матки синтезируют ТФР- β , который по аутокринному механизму влияет на эндометрий и готовит его к инвазии бластоцисты. С другой стороны ТФР- β может синтезировать и сам эмбрион.

Выводы

Эмбриональный ТФР- β стимулирует процессы апоптоза в тканях матки и путем инактивации клеток-киллеров подавляет иммунную систему матери и таким образом подготавливает матку к инвазии бластоцисты. На 6-й день после оплодотворения, перед самым началом имплантации, маточные крипты синтезируют неактивный комплекс ЭФР с транспортными белками, который вступит в активное состояние и будет способствовать образованию «окна имплантации» – состояния, исключительно во время которого может произойти имплантация эмбриона в полость матки.

Список литературы

1. Zhang, H. Targeting multiple signal transduction pathways / H. Zhang, F. Burrows // Journal of molecular medicine. – 2004. – Vol. 82, № 8. – P. 488–499.
2. Mechanisms of Disease: Implantation and the Survival of Early Pregnancy / E. R. Norwitz [et al.] // The New England journal of medicine. – 2001. – Vol. 345, №19. – P. 1400–1408.
3. Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation / S. Tranguch [et al.] // Journal Cellular and Molecular Life Sciences. – 2005. – Vol. 62, №17. – P. 1964–1973.
4. Carpenter, G. The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling // Bioassays. – 2000. – Vol. 22, №8. – P. 697–707.
5. Mendelsohn, J. Epidermal Growth Factor Receptor Targeting in Cancer / J. Mendelsohn, J. Baselga // Seminars of oncology. – 2006. – Vol. 33, №4. – P. 369–385.
6. The crosstalk between EGF, IGF, and Insulin cell signaling pathways – computational and experimental analysis / R. Zielinski [et al.] // BMC Systems biology. – 2009. – Vol. 3, № 88 – P. 469–489.
7. Dual effect of transforming growth factor β 1 on cell adhesion and invasion in human placenta trophoblast cells / Mei-rong Zhao [et al.] // Reproduction. – 2006. – Vol. 132. – P. 333–341.
8. Localization of transforming growth factor at the human fetal–maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation / C.H. Graham [et al.] // Biology of reproduction. – 1992. – Vol. 46. – P. 561–572.
9. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta / R.L. Jones [et al.] // Reproduction. – 2006. – Vol. 132. – P. 217–232.